



⑫<sup>A</sup> **Terinzagelegging** ⑪ **8800350**

Nederland

⑲ NL

- ⑤<sup>4</sup> **Synthetische galanthamine-derivaten, werkwijze voor het bereiden daarvan, en farmaceutische samenstellingen.**
- ⑤<sup>1</sup> Int.Cl.: C07D 491/048, A61K 31/55.
- ⑦<sup>1</sup> Aanvrager: Stichting Biomedical Research & Advice Group te Eindhoven.
- ⑦<sup>4</sup> Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.  
Vereenigde Octroobureaux  
Nieuwe Parklaan 107  
2587 BP 's-Gravenhage.

- ②<sup>1</sup> Aanvraag Nr. 8800350.
- ②<sup>2</sup> Ingediend 12 februari 1988.
- ③<sup>2</sup> --
- ③<sup>3</sup> --
- ③<sup>1</sup> --
- ⑥<sup>2</sup> --

- ④<sup>3</sup> Ter inzage gelegd 1 september 1989.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Titel:

Synthetische galanthamine-derivaten, werkwijze voor het bereiden daarvan, en farmaceutische samenstellingen.

De uitvinding heeft betrekking op nieuwe synthetische galanthaminederivaten, alsmede op een werkwijze voor het bereiden daarvan en op farmaceutische samenstellingen die een van de nieuwe synthetische galanthamine-derivaten bevatten.

Galanthamine is een amaryllidaceae-alkaloïde met formule (4), dat in 1930 voor het eerst werd geïsoleerd uit het species *Lycoris radiata*. Later is galanthamine in vele amaryllidaceae soorten aangetoond, waaronder *Galanthus* en *Leucojum* soorten. Galanthamine heeft een acetylcholinesterase remmende werking, zij het lager dan de in de handel verkrijgbare cholinesterase-remmers neostigmine, pyridostigmine en edrophonium.

Deze geneesmiddelen zijn klinisch effectieve antagonisten van niet-depolariserende spierrelaxantia. Aangenomen wordt dat hun acetylcholinesterase remmende werking aanleiding geeft tot een verlenging van de verblijftijd van acetylcholine bij het postsynaptische membraan, waarbij dit acetylcholine de spierrelaxantia van de motorische eindplaat verdringt. Naast hun nicotine-achtige werking op het postsynaptische membraan van dwarsgestreepte spieren vertonen deze cholinesterase remmers ongewenste, muscarine-achtige cholinerge bijwerkingen op het hart en in de longen. De op het hart optredende bijwerkingen zijn vooral bradycardie en dysritmieën. Om effecten zoals bradycardie na toediening van cholinesterase remmers te voorkomen moeten atropine of andere anticholinergica worden toegediend. Een voordeel van galanthamine boven de vermelde geneesmiddelen is de afwezigheid van significante muscarine-achtige bijwerkingen en het antagoneren

8800350

van de ademhalingsdepressieve werking van de opioïden. Klinisch gebruik van galanthamine als cholinesterase remmer is in de praktijk echter vanwege zijn relatief lage activiteit in hoofdzaak beperkt gebleven tot het  
5 opheffen van de door verschillende curare-achtige stoffen veroorzaakte neuromusculaire blokkering.

Bij eerdere onderzoeken is gebleken dat een kwaternisering van het op de 10-plaats gelegen stikstof-  
aatom met verzadigde alkylgroepen met 1-5 koolstofatomen  
10 en met een benzylgroep mogelijk is. Het tegenion is daarbij jodide, hydroxyde of chloride. Deze gekwaterni-  
seerde galanthamine-derivaten bleken een sterkere anti-  
cholinesterasewerking te vertonen dan galanthamine zelf.

Ook is bekend om de op de 3-plaats gelegen  
15 hydroxylgroep te veresteren, bijv. tot het acetaat of het 2'-hydroxybutyraat.

In 1976 werd 6-0-demethylgalanthamine met formule (5), sanguinine genaamd, in zeer lage concentratie beneden 0,01 % aangetroffen in en geïsoleerd uit *Lycoris sanguinea*  
20 Maxim. var. *Kiushiana* Makino. Later is ook het 3-0-2'(R)-hydroxybutyrylderivaat daarvan geïsoleerd uit *Leucojum Asetivum* L.

Totnogtoe is men er niet in geslaagd om sanguinine te synthetiseren. Pogingen daartoe zijn beschreven  
25 door Kametani et al, J. Chem. Soc. (C) 1971, blz. 590-592, maar deze pogingen bleken vruchteloos. De door Kametani geuite veronderstelling, dat 6-0-demethylgalanthamine een sterkere analgetische werkzaamheid zou bezitten dan galanthamine zelf, kon dan ook niet worden geverifi-  
30 eerd.

Na een uitvoerig onderzoek is nu een methode gevonden voor het bereiden van 6-0-demethylgalanthamine en daarvan afgeleide verbindingen, en is gevonden dat deze verbindingen waardevolle farmacologische eigenschap-  
35 pen bezitten, in het bijzonder een perifeer werkende anticholinesterase activiteit vertonen, gepaard gaande

. 8800350

aan het nagenoeg ontbreken van muscarine-achtige cholinerge bijwerkingen op het hart en in de longen, welke klinische toepassing als antagonist voor niet-depolariserende neuromusculair blokkering mogelijk maakt.

- 5 De uitvinding betreft op de eerste plaats synthetische galanthamine-derivaten met formule (1) waarin  $R^1$  staat voor H, OH of  $OCOR^2$ , en  $R^2$  staat voor een alkyl- of hydroxyalkylgroep met 1-5 koolstofatomen,
- 10 en gekwaterniseerde galanthamine-derivaten met formule (2) waarin  $R^1$  en  $R^2$  de bovengenoemde betekenissen hebben,  $R^3$  staat voor een alkylgroep met 1-5 koolstofatomen, een alkenylgroep met 2-5 koolstofatomen, of een benzyl-
- 15 groep; en  $X^\ominus$  staat voor een anion, alsmede bifunctionele vormen van de galanthamine-derivaten met de formules (1) en (2).

- Met bifunctionele vormen van de onderhavige
- 20 galanthamine-derivaten worden zg. "bulky esters" bedoeld. Sommige geneesmiddelen zijn actiever in hun bifunctionele vorm, zoals de bekende geneesmiddelen ambenoniumchloride, demecariumbromide en atracurium met de formules 9-11. Bifunctionele vormen van de onderhavige galanthamine-
- 25 rivaten kunnen worden verkregen door kwaternisering met bifunctionele alkylhalogeniden zoals verbindingen met de formules 12-19 (waarin X een halogeenatoom voorstelt en n een geheel getal van 1 of hoger voorstelt), of door carbamaatvorming met bifunctionele carbamoylhalo-
- 30 geniden zoals verbindingen met formule 20.

- In het eerste geval, kwaternisering met bifunctionele alkylhalogeniden, wordt een verbinding met formule 1 gealkyleerd met een bifunctioneel alkylhalogenide, waardoor een bifunctionele verbinding ontstaat met onderling
- 35 verbonden kwaternaire stikstofatomen (analoog aan ambenoniumchloride en atracurium). In het tweede geval, carbamaat-

.8800350

vorming met bifunctionele carbamoylhalogeniden, wordt een verbinding met formule 1 of, bij voorkeur, een verbinding met formule 2, geacyleerd met een bifunctioneel carbamoylhalogenide, waardoor een bifunctionele verbinding  
5 ontstaat waarvan de twee functionele eenheden via de op de 6-plaats gelegen fenolische hydroxylgroepen met elkaar zijn verbonden (analoog aan demecariumbromide).

Het tegenion van de verbindingen met formule 2 dient een farmaceutisch aanvaardbaar anion te zijn.  
10 Dergelijke anionen zijn op zichzelf aan de deskundigen bekend, bijvoorbeeld chloride, bromide, jodide, acetaat, methylsulfaat, e.d. Doorgaans geven de meest ionogene tegenionen de beste resultaten.

De grootste farmacologische activiteiten worden  
15 bereikt met de verbindingen met formule (2), d.w.z. de gekwaterniseerde derivaten van 6-0-demethylgalanthamine. De grootste voorkeur hebben N-allyl-6-0-demethylgalanthaminiumjodide en -methylsulfaat, derhalve synthetische galanthamine-derivaten met formule (2), waarin  
20  $R^3$  een allylgroep voorstelt,  
 $X^\ominus$  een jodide of methylsulfaat anion voorstelt, en  
 $R^1$  een hydroxylgroep voorstelt.

Bij farmacologisch onderzoek werd bijvoorbeeld vastgesteld, dat N-allyl-0-6-demethylgalanthaminiumjodide  
25 een met neostigmine methylsulfaat vergelijkbare farmacodynamische werking vertoont met een snellere ontplooiing van de werking en een vrijwel even lang aanhoudende werking, terwijl de cardiovasculaire bijwerkingen significant minder zijn. Daardoor heeft deze verbinding volgens  
30 de uitvinding een bredere veiligheidsmarge dan neostigmine.

De uitvinding betreft verder farmaceutische samenstellingen met anti-cholinesterase activiteit, die een synthetisch galanthamine-derivaat volgens de uitvinding omvatten, naast een of meer farmaceutisch  
35 aanvaardbare dragers, verdunningsmiddelen en/of adjuvantia. Dergelijke stoffen zijn aan de deskundigen bekend, evenals

. 880 035 0

de verschillende vormen die farmaceutische samenstellingen, afhankelijk van de beoogde toedieningswijze, kunnen hebben. Desgewenst kunnen de farmaceutische samenstellingen ook nog andere actieve componenten bevatten. De toedieningswijzen van de bekende anticholinesterase geneesmiddelen zijn ook bruikbaar voor de farmaceutische samenstellingen volgens de uitvinding. Voorbeelden zijn intraveneuze, intramusculaire, parenterale en orale toediening; het farmaceutische preparaat kan bijv. een injectievloeistof of een ampul zijn of de vorm van tabletten hebben.

Ook betreft de uitvinding een werkwijze voor het bereiden van de synthetische galanthamine-derivaten volgens de uitvinding door een zuuradditiezout van een verbinding met formule (3) met behulp van boortribromide in een organisch oplosmiddel om te zetten in een 6-0-demethylverbinding met formule (1) en deze verbinding desgewenst op een op zichzelf bekende wijze om te zetten in een gekwaterniseerd galanthamine-derivaat met formule (2).

Zeer geschikt is gebleken een werkwijze waarbij het hydrobromide zout van een verbinding met formule (3) bij een temperatuur van 0-20°C wordt behandeld met 8/3 tot 3 molequivalenten  $\text{BBr}_3$  in dichloormethaan als oplosmiddel en het daarbij gevormde boorcomplex door zacht verwarmen in een waterige natriumbicarbonaat-oplossing wordt omgezet in een 6-0-demethylverbinding met formule (1), waarna deze verbinding desgewenst door kwaternisering in watervrij milieu wordt omgezet in een gekwaterniseerd galanthamine-derivaat met formule (2).

Verbindingen volgens de uitvinding, waarin  $\text{R}^1$  staat voor een hydroxylgroep, kunnen worden verkregen, uitgaande van zuuradditiezouten van galanthamine. Wanneer men verbindingen wil bereiden, waarin  $\text{R}^1$  waterstof voorstelt, kan men daartoe een deoxygenering toepassen, bijv. een sulfonering van de 3-OH groep gevolgd door reductie

. 8800350

met bijvoorbeeld  $\text{LiAlH}_4$ . Overigens kan men op zichzelf bekende methode toepassen om de hydroxylgroep te vervangen door een waterstofatoom.

Verbindingen volgens de uitvinding, waarin  
5  $\text{R}^1$  staat voor een  $\text{OCOR}^2$  groep, kunnen door op zichzelf bekende acyleringsreacties worden verkregen.

Kwaterniseringsmethoden zijn eveneens op zichzelf bekend. Zeer geschikte kwaterniseringsmiddelen zijn de halogeniden, zoals alkyl- en allyljodide, -chloride,  
10 -bromide.

De uitvinding zal aan de hand van de hiernavolgende beschrijving van uitgevoerde experimenten en Schema 1 worden toegelicht.

#### 15 Bereidingsexperimenten

##### N-Allylgalanthaminiumjodide met formule (7e)

Galanthamine-hydrobromide (0,368 g, 1,0 mmol)  
20 wordt onder matig verwarmen opgelost in water (10 ml). Na afkoelen voegt men NaOH (1,1 ml 1M, 1,1 mmol) toe en extraheert men de waterige fase met dichloormethaan (3 x 20 ml). De verzamelde organische lagen worden gedroogd boven  $\text{MgSO}_4$  en ingedampt onder verminderde druk. Het  
25 kristallijne residu (0,287 g, 100%) wordt getrittureerd met diëthylether en afgefiltreerd: smeltpunt 126-127°C, en is in alle opzichten identiek met galanthamine. Galanthamine (0,287 g, 1,0 mmol), opgelost in acetonitril (8 ml), wordt behandeld met allyljodide (0,189 g, 1,125  
30 mmol). Na opkoken onder reflux gedurende 4 uur worden het solvent en de overmaat allyljodide verwijderd onder vacuüm. Het residu (0,450 g, 98%) wordt getrittureerd met ether (10 ml) en vervolgens opgenomen in een mengsel chloroform-methanol (99 : 1). Chromatografische zuivering  
35 over kiezelgel (8 g) met chloroform-methanol (19 : 1 → 3 : 1) en tritratie van het residu met diëthylether

. 8800350

geeft (7e) (0,325 g, 71%) met smeltpunt 250 - 255°C (ontleding). Analytisch zuiver materiaal ontstaat na kristallisatie uit ethylacetaat-methanol (6 : 1) : smeltpunt 253 - 256°C (ontleding).  $C_{20}H_{26}INO_3$  (455,34) berekend  
 5 C 52,76, H 5,76, N 3,08; gevonden C 52,69, H 5,84, N 3,23.  $[\alpha]_D^{27} - 99^\circ$  (c 1,05, methanol).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ - $CD_3OD$ , 9 : 1)  $\delta$  : 6,95 (d, J 8 Hz, 1), 6,65 (d, J 8 Hz, 1), 6,37 (d, J 10 Hz, 1), 6,1 - 5,6 (m, 4), 5,20 (d, J 14 Hz, 1), 4,82 (m, 1), 4,68 (m, 2), 4,65 (m, 1), 4,2 -  
 10 3,6 (m, 3), 4,0 (breed, 1), 3,80 (s, 3), 2,96 (s, 3), 2,5 - 2,0 (m, 4).

6-0-Demethylgalanthamine met formule (5)

15 Aan een in een ijsbad gekoelde suspensie van galanthamine-hydrobromide (3,68 g, 0,01 mol) in dichloormethaan (45 ml) wordt onder stikstof druppelsgewijs boortribromide (27 ml 1M in dichloormethaan) toegevoegd (30 minuten). Tijdens het toevoegen treedt coagulatie  
 20 op die nadien weer verdwijnt. Na 75 minuten bijkomende reactie bij kamertemperatuur, wordt het mengsel uitgegoten in warm water (50°C, 50 ml). Na de verdamping van de dichloormethaan neutraliseert men met natriumbicarbonaat (16,8 g, 0,20 mol). Na de vrijzetting van  $CO_2$  wordt  
 25 de licht basische waterige oplossing geëxtraheerd met dichloormethaan (5 x 75 ml). Drogen en indampen geeft een als rozetten kristalliserend residu (2,04 g, 71%), dat analytisch zuiver is na kristallisatie uit aceton. Smeltpunt 209 - 212°C (ontl.) lit. 210 - 213°C.  $C_{16}H_{19}NO_3$   
 30 (273,33) berekend C 70,31, H 7,01, N 5,12; gevonden C 70,44, H 7,11, N 5,09.  $[\alpha]_D^{27} - 132^\circ$  (c 0,90, methanol), lit(3) - 133° (ethanol).  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$  : 6,65 (d, J 8 Hz, 1), 6,62 (d, J 8 Hz, 1), 6,18 (d, J 10 Hz, 1), 5,99 (dd, J 10 en 4,5 Hz, 1), 4,95 (s, 2), 4,61 (m,  
 35 1), 4,23 (m, 1), 4,22 (d, J 15 Hz, 1), 3,79 (d, J 15 Hz, 1), 3,37 (m, 1), 3,16 (dt, J 15 en 4 Hz, 1), 2,57

. 8800350



(dt, J 15 en 1,5 Hz, 1), 2,52 (s, 3), 2,25 - 2,1 (m, 2), 1,78 (dd, J 15 en 3 Hz, 1).

5 N-ethyl-6-0-Demethyl-galanthaminiumjodide met formule (8a)

Men laat een suspensie van 6-0-demethylgalanthamine (0,100 g, 0,366 mmol) in aceton (4 ml) reageren met joodethaan (0,064 g, 0,41 mmol) gedurende 40 uur  
10 bij kamertemperatuur. De suspensie verandert mettertijd van uiterlijk. Na filtratie en wassen met aceton (4 ml), isoleert men het ethylgalanthaminederivaat (8a) (0,115 g, 73%) met smeltpunt 243 - 248°C (ontl.). Analytisch zuiver materiaal (kleurloze plaatjes) verkrijgt  
15 men door kristallisatie uit methanol (1 : 20) : smeltpunt 249 - 250°C (ontl.).  $C_{18}H_{24}INO_3$  (429,30) berekend C 50,36, H 5,63, N 3,26; gevonden C 50,51, H 5,42, N 3,03.  $[\alpha]_D^{27} - 109^\circ$  (c 0,99, methanol).  $^1H$  NMR ( $CD_3OD - D_2O$ )  
 $\delta$  : 6,85 (s, 2), 6,21 (d, J 10 Hz, 1), 6,12 (dd, J 10  
20 en 4,5 Hz, 1), 5,1 - 4,7 (m, 3), 4,94 (d, J 15 Hz, 1), 4,37 (d, J 15 Hz, 1), 4,32 (m, 3), 3,74 (q, J 7 Hz, 2), 2,91 (s, 3), 2,59 (dt, J 15 en 1,5 Hz, 1), 2,37 (m, 1), 2,23 (ddd, J 15, 5 en 4 Hz, 1), 2,07 (m, 1), 1,58 (t, J 7 Hz, 3).

25

N-Allyl-6-0-demethylgalanthaminiumjodide met formule (8b)

Aan een suspensie van 6-0-demethylgalanthamine  
30 (0,819 g, 3,0 mmol) in aceton (30 ml) voegt men allyljodide (0,574 g, 3,375 mmol) toe. Na 18 uur roeren bij kamertemperatuur is de suspensie van uiterlijk veranderd en wordt afgefiltreerd en gewassen met aceton (30 ml). Men isoleert (8b) (0,831 g, 63%) met smeltpunt 228 -  
35 230°C (ontl.). Herkristallisatie uit methanol (1 : 10) levert analytisch zuiver (8b) op. Smeltpunt 232 - 233°C (ontl.).  $C_{19}H_{24}INO_3$  (441,31) berekend C 51,71, H 5,48,

. 8800350

N 3,17; gevonden C 51,49, H 5,76, N 3,05.  $[\alpha]_D^{27} - 121^{\circ}$   
(c 1,01, methanol).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD} - \text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 6,85 (s,  
2), 6,35 - 6,15 (m, 2), 6,12 (dd, J 10 en 4,5 Hz, 1),  
5,89 (d, J 10 Hz, 1), 5,88 (d, J 16 Hz, 1), 4,97 (d,  
5 J 14 Hz, 1), 4,9 - 4,7 (m, 5), 4,41 (d, J 14 Hz, 1),  
4,3 (m, 3), 2,92 (s, 3), 2,59 (dt, J 15 en 1,5 Hz, 1),  
2,37 (m, 1), 2,23 (ddd, J 15, 5 en 4 Hz, 1), 2,12 (m,  
1).

10

### Resultaten

#### 15 a) Vrijzetting van galanthamine (4) uit zijn HBr-zout (6)

De neutralisatie van galanthaminiumbromide  
(6), met 0,1 M NaOH is op zich een triviale zaak. Toch  
dient rekening gehouden te worden met de relatief geringe  
20 oplosbaarheid van galanthamine in een aantal organische  
oplosmiddelen, en de niet onbelangrijke oplosbaarheid  
in water. De verdelingscoëfficiënt tussen water en diëthyl-  
ether bedraagt ongeveer 1,25; tussen water en dichloor-  
methaan 0,06. Dit impliceert dat extractie bij voorkeur  
25 met dit laatste solvent wordt uitgevoerd.

#### b) Kwaternisering van galanthamine met jodiden

De reactie van galanthamine met joodmethaan  
30 verloopt zeer snel, met de hogere homologen relatief  
langzaam. In tegenstelling tot eerder beschreven methoden  
werd een polair solvent gebruikt, namelijk acetonitril.  
De lagere homologen (7a, 7b) zijn direct kristallijn  
te verkrijgen, de hogere, homologen (7c - 7e), vereisen  
35 daarentegen een voorafgaandelijke chromatografische  
zuivering (Kieselgel, chloroform-methanol).

De NMR-gegevens wijzen op een  $\beta$ -selectieve N-alkylering

. 8800350

: de N-methylgroep is relatief meer afgeschermd dan de nieuw ingeplante groep en absorbeert rond 2,95 ppm. In het N-methylgalanthaminiumjodide (7a), absorbeert de ene methylgroep bij 2,95 en de andere bij 3,50 ppm.

5 Hieruit volgt dat - rekening houdend met de conformationele structuur van galanthaminiumderivaten - de oorspronkelijk aanwezige methylgroep  $\alpha$ -axiaal ingeplant staat in deze quaternaire derivaten. Het niet eerder beschreven N-allylderivaat (7e) werd geïsoleerd

10 met een rendement van 71%.

c) 6-0-Demethylgalanthamine (Sanguinine), met formule (5)

15 De omzetting van galanthamine in zijn 6-0-demethyl-derivaat (5) werd reeds eerder geprobeerd. De gewenste verbinding kon echter niet verkregen worden wegens de te drastische reactieomstandigheden (fusie met pyridiniumchloride; behandeling met NaOH en hydrazinehydraat

20 in diëthyleenglycol bij 200°C). Zuurgekatalyseerde demethylering met de klassieke reagentie  $\text{AlCl}_3$  en HBr resulteert in competitieve doorbraak van de etherbrug 0 - 5.

Selectieve 6-0-demethylering werd nu verwezenlijkt

25 met een 1M-oplossing van boortribromide in dichloormethaan. Ze dient uitgevoerd te worden met 8/3 à 3 molequivalenten reagens bij 0 - 20°C. Het gebruik van 2 molequivalenten resulteert in slechts weinig demethylering. Verder is het aangewezen het HBr-zout (6) en niet de vrije

30 base te bezigen. Na de reactie ( ~ 2 uur) is een boorcomplex ontstaan, dat bij zacht verwarmen in waterig  $\text{NaHCO}_3$  overgaat in (5). Extractie met dichloormethaan levert relatief zuiver produkt op, dat voor analytische zuivering gekristalliseerd wordt uit aceton maar dat als

35 zodanig te gebruiken is in de kwaternisering. Verbinding

. 8800350

(5), verkregen in 66% rendement, vertoont een smeltpunt, NMR-spectrum en draaiingshoek zoals eerder aangegeven voor sanguinine.

5 d) N-Alkyl-6-0-demethylgalanthaminiumjodiden met formule (8)

De kwaternisering van 6-0-demethylgalanthamine (5) is preparatief beter uitvoerbaar dan de 6-0-demethylering van galanthaminiumderivaten (7a - 7e) : in het  
10 eerste geval verloopt de reactie in watervrij milieu, in suspensie in aceton of acetonitril, en beperkt de opwerking zich tot affiltreren en kristalliseren; in het tweede geval rijst het probleem van de isolering  
15 van een hydrofiel reactieproduct uit het waterig milieu nodig voor de opwerking van het gevormde boorcomplex. Beide benaderingen zijn uitgetest en enkel de eerste, die ook de meest convergente is, is succesvol.  
De kwaternisering is uitgevoerd bij kamertemperatuur  
20 en duurt ongeveer 1 dag : ze verloopt heterogeen maar het substraat is toch voor ongeveer 1 % oplosbaar in aceton terwijl (8a) en (8b) virtueel onoplosbaar zijn. Het ethyl derivaat (8a) is voor 73 %, het allylderivaat (8b) voor 63 % verkregen.

25

Farmacologische experimenten

De farmacologische eigenschappen van enkele verbindingen volgens de uitvinding werden vergeleken  
30 met die van neostigmine methylsulfaat in de volgende testprocedures.

1. nervus sciaticus - musculus tibialis anterior preparaat bij de rat

35

Na anesthesie met pentobarbital werden bij

. 8800350

ratten van 250-400 g beide halsaders van een cannule voorzien voor de toediening van geneesmiddelen. Een halsslagader werd eveneens van een cannule voorzien om de slagaderlijke bloeddruk te kunnen meten en registreren. In de luchtpijp werd een buis gebracht en de beademing werd geregeld met behulp van een Braun luchtpomp. De pees van de linker tibialisspier werd vrijgemaakt, doorsneden en verbonden met een krachtverplaatsingstransducer. De nervus sciaticus werd onderbonden en gestimuleerd via een bipolaire elektrode met supramaximale 0,1 Hz stimuli met een duur van 0,2 milliseconden. De kracht van de spiercontracties werd op een polygraaf opgenomen. De ratten werden met verwarmingslampen op een temperatuur van 37°C gehouden. Via continue infusie werd intraveneus pancuroniumbromide (Pavulon®) toegediend totdat ongeveer 90-95% verlaging van de kracht van de spiercontracties was verkregen. Deze infusiesnelheid werd daarna gedurende het gehele experiment aangehouden. Nadat een gedurende ten minste 15 minuten constant blijvende blokkering was bereikt werd één van de onderzochte geneesmiddelen intraveneus als bolus toegediend.

## 2. hemidiafragma van de rat

Van Wistar mannetjesratten (280-320 g) werden de linker hemidiafragma's met de bijbehorende middenrifzenuwen verwijderd en overgebracht in een orgaanbad dat een op 37°C gehouden Krebs oplossing bevatte en voorzien werd van een gasmengsel van zuurstof en 5% CO<sub>2</sub>. De zenuw werd via elektroden gestimuleerd bij een frequentie van 0,1 Hz met supramaximale (rechthoekige) pulsen van 0,3 milliseconden. Na ten minste 30 minuten equilibreren werd aan het bad pancuroniumbromide (Pavulon®) toegevoegd om een blokkering van ongeveer 90% te verkrijgen (concentratie in het bad ongeveer  $8 \times 10^{-6}M$ ). Nadat een gedurende 5 minuten stabiele blokkering was bereikt

. 8800350

werden oplossingen van de onderzochte geneesmiddelen cumulatief aan het bad toegevoegd.

### 3. geïsoleerd geperfundeerd hart van de rat

5

Na anesthesie met diethylether van Wistar mannetjes-  
ratten (270-300 g) en na heparinizatie werden snel de  
harten verwijderd. Vervolgens werd het hart volgens  
de methode van Langendorff geperfundeerd. De perfusievloeistof  
10 bevatte 128 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,35 mM CaCl<sub>2</sub>;  
1,05 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,42 mM NaHPO<sub>4</sub>; 20,2 mM NaHCO<sub>3</sub>; en 11,1  
mM glucose. De pH van de perfusievloeistof bedroeg na  
beluchting met 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>  $7,35 \pm 0,05$  (37°C). De  
druk van de linker ventrikel (LVD) werd gemeten met  
15 behulp van een catheter, die in de linker ventrikel  
was gebracht en met een druktransducer was verbonden.  
Met behulp van twee zilveren elektrodes werd een bipolair  
electrocardiogram verkregen; de ene elektrode was verbonden  
20 met de metalen inbrengcannule en de andere elektrode  
was verbonden met de apex van de ventrikel. De coronaire  
doorstroming (volumehoeveelheid perfusievloeistof per  
tijdseenheid) werd gemeten met een microprocessor die  
de perfusiedruk regelde door instellen van de peristaltische  
perfusiepomp.

25

### 4. nervus ulnaris-adductor pollicis spier preparaat bij de aap (Macaca Arctoides)

Na anesthesie met ketamine hydrochloride (Ketalar®),  
30 in een dosering van 10 mg/kg intramusculair, werd bij  
apen van 8,5-13,2 kg van beiderlei geslacht de trachea  
geïntubeerd met een orale tube (Portex, maat 7,5).

Vervolgens werden drie intraveneuze cannules  
in respectievelijk vena saphena magna links en rechts  
35 en in de vena cephalica links aangebracht voor de toediening  
van geneesmiddelen.

. 8800350

De anesthesie werd voortgezet door middel van continue intraveneuze toediening van thiopenthal natrium (Nesdonal) in een dosering van 10 mg/kg/uur (WTi Holland infuuspomp).

5 De dieren werden gedurende het experiment beademd met een Loosco Infant Ventilator M.K. 11 met een frequentie van 35/min., een slagvolume van 15 ml/kg en een FiO<sub>2</sub> van 30%, onder gelijktijdige registratie van het capnogram (Capnograph Mark 11).

10 De apen werden door middel van een HSE temperatuur regulator-type 313 rectaal op een temperatuur van 37°C gehouden.

Meting van de arteriële bloeddruk in de arteria femoralis (angiocath. 22G) vond plaats met een Gould  
15 Statham transducer en een HSE elektro manometer. De hartfrequentie werd gemeten met behulp van een biotachometer BT-1200. De nervus ulnaris werd gestimuleerd met supra-maximale 0,1 Hz stimuli met een duur van 0,2 milliseconden afkomstig van een Grass S 88 stimulator.

20 De isometrische contracties van de adductor pollicis spier werden gemeten met behulp van een Gould Statham force transducer UTC 3 en een Muscle Relaxation Monitor MK 11.

Alle registraties werden verricht met een Physio-  
25 polygraph varioscript (Schwarzer).

Via continue infusie (Dascou 300 infuuspomp) werd intraveneus pancuronium bromide (Pavulon®) toegediend totdat ongeveer 90% verlaging van de kracht van de spier-  
contracties was verkregen. Deze infusiesnelheid werd  
30 daarna gedurende het gehele experiment aangehouden. Nadat een gedurende ten minste 20 minuten constant blijvende blokkering was bereikt werd één van de onderzochte farmaca intraveneus toegediend. Het doseringsschema voor neostigmine methylsulfaat (n=3) was 5,10 en 20; 10,20 en 5; en 20,5  
35 en 10 /ug/kg en voor N-allyl-0-6-demethylgalanthaminejodide (n=4) 5,10 en 20; 10,20 en 5; en 20,5 en 10 /ug/kg,

. 8800350

deze laatste dosering twee keer.

Ter vermindering van cumulatie werd na uitwerking van het voorgaande effect een pauze van ten minste 30 minuten ingelast.

- 5           Aan het eind van het experiment werden beide  
farmaca in een dosering van 40  $\mu\text{g/kg}$  intraveneus toege-  
diend, met name ter bestudering van eventuele cardiovascu-  
laire bijwerkingen.

10

#### Calculaties

- Dosis-respons krommen werden meestal gedaan volgens het principe van een rekenkundige reeks: x,  
15  $1/2x$  en  $1/4x$ .

De  $ED_{50}$  waarden werden berekend met behulp van lineaire regressie. Gemiddelde waarden  $\pm SD/\sqrt{n-1}$ .

#### 20 Resultaten

##### 1. nervus sciaticus-musculus tibialis anterior preparaat bij de rat

25

In dit experiment werd de antagonistische werking van neostigmine, galanthamine en galanthamine analoga ten opzichte van een continue neuromusculaire blokkade van ongeveer 90-95% met pancuronium bestudeerd.

- 30           Zoals uit tabel 1 volgt, was N-allyl-6-0-demethylgalanthaminejodide het meest potente analogon van galanthamine.

- De  $ED_{50}$  waarden (dosering van de antagonist welke 50% antagonisme geeft) waren voor neostigmine  
35 en N-allyl-6-0-demethylgalanthamine respectievelijk  
7,4 en 8,5  $\mu\text{g/kg}$ .

De dosis-respons krommen van neostigmine en

. 8800350



N-allyl-6-0-demethylgalanthamine zijn weergegeven in tabel 2 en fig. 1. In een dosering van 15  $\mu$ g/kg hadden beide farmaca ongeveer dezelfde werkingsduur (duur 50%, tijd van toediening tot 50% afname van het maximale effect); voor neostigmine  $13,29 \pm 1,20$  min. en voor N-allyl-6-0-demethylgalanthamine  $11,83 \pm 1,06$  min. De duur tot het maximale effect bij bovengenoemde dosering was voor N-allyl-6-0-demethylgalanthamine  $2,47 \pm 0,20$  min. en voor neostigmine  $3,38 \pm 0,20$  min. (tabel 2).

10

## 2. hemidiafragma van de rat

Zowel neostigmine, als N-allyl-6-0-demethylgalanthamine antagoneerden de neuromusculaire blokkade van pancuronium.

15

De  $EC_{50}$  waarden (de concentratie welke 50% antagonisme geeft) waren voor beide farmaca  $1-2 \cdot 10^{-7}$  Mol (fig. 2 en 3); het antagonisme van N-allyl-6-0-demethylgalanthamine bleek echter effectiever te zijn.

20

## 3. geïsoleerd geperfundeerd hart van de hart

Tabel 3 toont de werking van neostigmine en N-allyl-6-0-demethylgalanthamine op het geïsoleerd geperfundeerd hart van de rat.

25

N-allyl-6-0-demethylgalanthamine had een significant kleiner negatief chronotroop effect dan neostigmine.

## 4. nervus ulnaris-adductor pollicis spier preparaat bij de aap

30

### 1. Antagonisme

35

De antagonistische werking van N-allyl-6-0-demethylgalanthaminejodide en neostigmine methylsulfaat bij de aap in doseringen van 5,10 en 20  $\mu$ g/kg intraveneus

. 880 035 0

zijn weergegeven in tabel 4 en fig. 4 en 5. Beide antag-  
nisten bezaten nagenoeg dezelfde potentie, de ED<sub>50</sub> bedroeg  
voor N-allyl-6-0-demethylgalanthamine 13,8 /ug/kg en  
voor neostigmine 12,7 /ug/kg; de tijd van toediening  
5 tot het maximale effect bedroeg voor N-allyl-6-0-demethyl-  
galanthamine ongeveer 50% van die voor neostigmine en  
de duur van werking van neostigmine was langer, ongeveer  
een factor 1,5.

## 10 2. Cardiovasculair

Voor beide farmaca werden bij doseringen van  
5,10 en 20 /ug/kg intraveneus geen significante cardio-  
vasculaire bijwerkingen, in de zin van veranderingen  
15 van hartfrequentie en gemiddelde arteriële bloeddruk,  
waargenomen.

Neostigmine methylsulfaat, in een dosering  
van 40 /ug/kg intraveneus, gaf echter aanleiding tot  
een daling van de hartfrequentie van  $40 \pm 7\%$  maximaal,  
20 terwijl de gemiddelde arteriële bloeddruk daalde met  
 $29 \pm 20\%$  (fig. 6). N-allyl-6-0-demethylgalanthaminejodide  
in dezelfde dosering liet een daling van de hartfrequentie  
zien van maximaal  $5 \pm 1\%$  en van de gemiddelde bloeddruk  
arterieel van  $4 \pm 4\%$  (fig. 6).

25 Op basis van de uitgevoerde experimenten kunnen  
de volgende gevolgtrekkingen worden gemaakt.

1. N-allyl-6-0-demethylgalanthaminejodide is het  
30 meest potente analogon in de serie van analoga van  
GalanthamineHBr.

2. N-allyl-6-0-demethylgalanthaminejodide is ongeveer  
even potent als neostigmine methylsulfaat, heeft een  
snellere ontplooiing van werking, een werkingsduur verge-  
35 lijikbaar met neostigmine, terwijl de cardiovasculaire  
bijwerkingen significant kleiner zijn. Daardoor heeft

. 8800350

deze verbinding een bredere veiligheidsmarge (therapeutische index) dan neostigmine in de dier-experimentele screeningstesten.

. 8800350

	Dosis μg/kg	Duur tot max.effect (min)	Antagonisme (%)	Duur 50% (min)	ED <sub>50</sub> (μg/kg)
Neostigmine methyلسulfaat	30	2,00±0,24	98±1	19,25±2,49	7,4
Galanthamine HBr	1000	3,20±0,78	79±7	22,16±4,51	340
N-Methyl- galanthamineI	250	0,84±0,15	98±1	10,21±2,51	46
N-ethyl- galanthamineI	250	1,24±0,12	84±2	9,33±1,90	18
N-propyl- galanthamineI	250	2,08±0,85	95±3	17,33±2,28	71
N-allyl- galanthamineI	250	1,13±0,34	91±2	13,62±1,61	21
N-butyl- galanthamineI	250	1,52±0,10	69±9	8,73±1,53	125
6-O-demethyl- galanthamineI	250	1,58±0,23	90±4	13,25±2,34	73
N-ethyl-6-O- demethylgalanthamineI	30	2,13±0,14	78±4	8,91±1,18	-
N-allyl-6-O demethylgalanthamineI	15	2,47±0,20	90±2	11,83±1,06	8,5

Tabel 1 De werking van neostigmine methyلسulfaat, galanthamineHBr en galanthamine analoga op de spierkracht van de tibialis anterior spier van de rat. De vermelde dosis was steeds de hoogste van de dosis-respons kromme. Pancuronium bromide werd continu geïnfundeed gedurende het experiment. ED<sub>50</sub> is de dosis van de antagonist welke 50% antaginisme van de door pancuronium veroorzaakte afname van de spierkracht geeft. Gemiddelde±SD/√n-1 en n=4 voor alle waarden. - = geen dosis-respons kromme.

.8800350

	Dosis ug/kg	Duur tot max.effect (min.)	Antagonisme %	Duur 50% (min)
Neostigmine methylsulfaat	30	2,00±0,24	98±1	19,25±2,49
	15	3,38±0,20	81±6	13,29±1,20
	7,5	2,60±0,32	48±8	7,50±0,52
N-allyl-6-O-demethyl- galanthamine I	15	2,47±0,20	90±2	11,83±1,06
	11	3,03±0,20	66±2	10,80±1,32
	7	2,30±0,21	38±6	8,10±0,81

Tabel 2 De werking van neostigmine methylsulfaat en N-allyl-6-O-demethylgalanthamineI op de spierkracht van de tibialis anterior spier van de rat. Pancuronium bromide werd continu geïnfundeerd gedurende het experiment. Gemiddelde±SD/ $\sqrt{n-1}$  en n=4 voor alle waarden.

	Concentratie (Mol)	LVD (%)	Coronaire perfusie	Frequentie
N-allyl-6-O-demethyl- galanthamine I	$3 \times 10^{-5}$	-3,1±1,3	-4,1±2,5	-6,1±1,9
	$10^{-4}$	-4,7±1,7	-3,2±1,4	-10,8±0,5
Neostigmine Methylsulfaat	$3 \times 10^{-5}$	+9,7±5,1	-6,3±2,0	-15,9±2,4

Tabel 3 De werking van N-allyl-6-O-demethylgalanthamineI en neostigmine methylsulfaat op het geïsoleerde geperfundeerde hart van de rat.

De gegevens zijn weergegeven als percentage toename of afname van de controle waarden LVD = linker ventrikel druk. Alle gegevens zijn de gemiddelden van vijf tot zeven experimenten. Gemiddelde±SD/ $\sqrt{n-1}$ .

. 8800350

	Dosis μg/kg	Duur tot max.effect (min)	Antagonisme (%)	Duur 50% (min)
Neostigmine methylsulfaat	20	10,84±0,47	72,3±5,0	39,73±0,62
	10	10,93±0,15	34,3±3,3	34,82±3,26
	5	9,87±0,31	13,0±2,0	25,42±2,66
N-allyl-6-O-demethyl- galanthamine I	20	4,07±0,20	67,3±6,4	23,47±4,09
	10	4,80±0,64	31,3±5,8	18,60±2,24
	5	5,00±0,37	14,5±3,7	16,73±1,57

Tabel 4 De werking van neostigmine methylsulfaat (n=3; o---o) en N-allyl-6-O-demethylgalanthamineI (n=4; ●—●) op de spierkracht van de adductor pollicis spier van de aap. Pancuronium bromide werd continu geïnfundeed gedurende het experiment. Gemiddelde±SD/√n-1.

. 8800350

Figuurbeschrijving

Fig. 1. De werking van neostigmine methylsulfaat  
5 (o---o) en N-allyl-6-0-demethylgalanthamine I (●—●)  
op de spierkracht van de tibialis anterior spier van  
de rat. Pancuronium bromide werd continu geïnfundeerd  
gedurende het experiment. Gemiddelde  $\pm$  SD/ $\sqrt{n-1}$  en n=4  
voor alle waarden.

10 Fig. 2. De werking van neostigmine methylsulfaat  
op de spierkracht van het indirect gestimuleerde hemidia-  
fragma van de rat; n=5.

Fig. 3. De werking van N-allyl-6-0-demethylgalan-  
thamine I op de spierkracht van het indirect gestimuleerde  
15 hemidiafragma van de rat; n=5.

Fig. 4. De werking van neostigmine methylsulfaat  
(n=3; o---o) en N-allyl-6-0-demethylgalanthamine I (n=4;  
●—●) op de spierkracht van de adductor pollicis spier  
van de aap. Pancuronium bromide werd continu geïnfundeerd  
20 gedurende het experiment. Gemiddelde  $\pm$  SD/ $\sqrt{n-1}$ .

Fig. 5. De werking van neostigmine methylsulfaat  
(n=3; o---o) en N-allyl-6-0-demethylgalanthamine I  
(n=4; ●—●) op de spierkracht van de adductor pollicis  
spier van de aap. Pancuronium bromide werd continu geïnfun-  
25 deerd gedurende het experiment. Gemiddelde  $\pm$  SD/ $\sqrt{n-1}$ .

Fig. 6. De invloed van neostigmine methylsulfaat  
(dosis 40  $\mu$ g/kg; n=3) en N-allyl-6-0-demethylgalanthamine  
I (dosis 40  $\mu$ g/kg; n=4) op hartfrequentie en gemiddelde  
arteriële bloeddruk bij de aap.

. 8800350

C O N C L U S I E S

1. Synthetische galanthamine-derivaten met formule  
(1)  
waarin  $R^1$  staat voor H, OH of  $OCOR^2$ , en  
 $R^2$  staat voor een alkyl- of hydroxyalkylgroep met 1-5  
5 koolstofatomen,  
en gekwaterniseerde galanthamine-derivaten met formule  
(2)  
waarin  $R^1$  en  $R^2$  de bovengenoemde betekenissen hebben,  
 $R^3$  staat voor een alkylgroep met 1-5 koolstofatomen,  
10 een alkenylgroep met 2-5 koolstofatomen, of een benzyl-  
groep; en  
 $X^\ominus$  staat voor een anion,  
alsmede bifunctionele vormen van de galanthamine-deriva-  
ten met de formules (1) en (2).
- 15 2. Synthetische galanthamine-derivaten met formule  
(2), waarin  
 $R^3$  een allylgroep voorstelt,  
 $X^\ominus$  een jodide of methylsulfaat anion voorstelt, en  
 $R^1$  een hydroxylgroep voorstelt.
- 20 3. Farmaceutische samenstelling met anti-cholines-  
terase activiteit, omvattende een synthetisch galanthamine-  
derivaat volgens conclusie 1 of 2, alsmede een of meerdere  
farmaceutisch aanvaardbare dragers, verdunningsmiddelen,  
en/of adjuvantia.
- 25 4. Werkwijze voor het bereiden van synthetische  
galanthamine-derivaten met de formules (1) en (2),  
waarin de symbolen de in conclusie 1 vermelde betekenissen  
hebben, door een zuuradditiezout van een verbinding  
met formule (3)
- 30 met behulp van boortribromide in een organisch oplosmiddel  
om te zetten in een 6-O-demethylverbinding met formule

. 8800350



(1) en deze verbinding desgewenst op een op zichzelf bekende wijze om te zetten in een gekwaterniseerd galanthamine-derivaat met formule (2).

5.           Werkwijze volgens conclusie 4, waarbij het
- 5   hydrobromide zout van een verbinding met formule (3) bij een temperatuur van 0-20°C wordt behandeld met 8/3 tot 3 molequivalenten BBr<sub>3</sub> in dichloormethaan als oplosmiddel en het daarbij gevormde boorcomplex door
- 10   sing wordt omgezet in een 6-0-demethylverbinding met formule (1), waarna deze verbinding desgewenst door kwaternisering in watervrij milieu wordt omgezet in een gekwaterniseerd galanthamine-derivaat met formule (2).

. 8800350

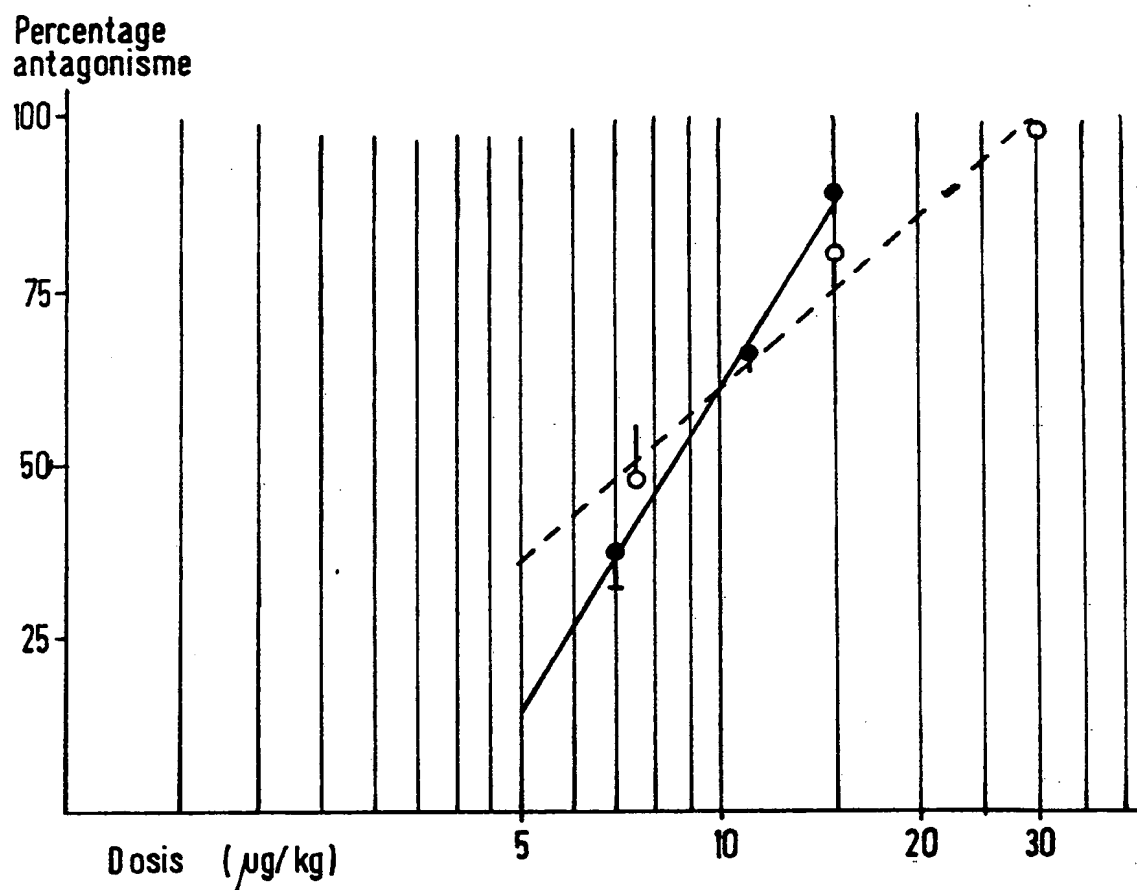


FIG. 1

8800350

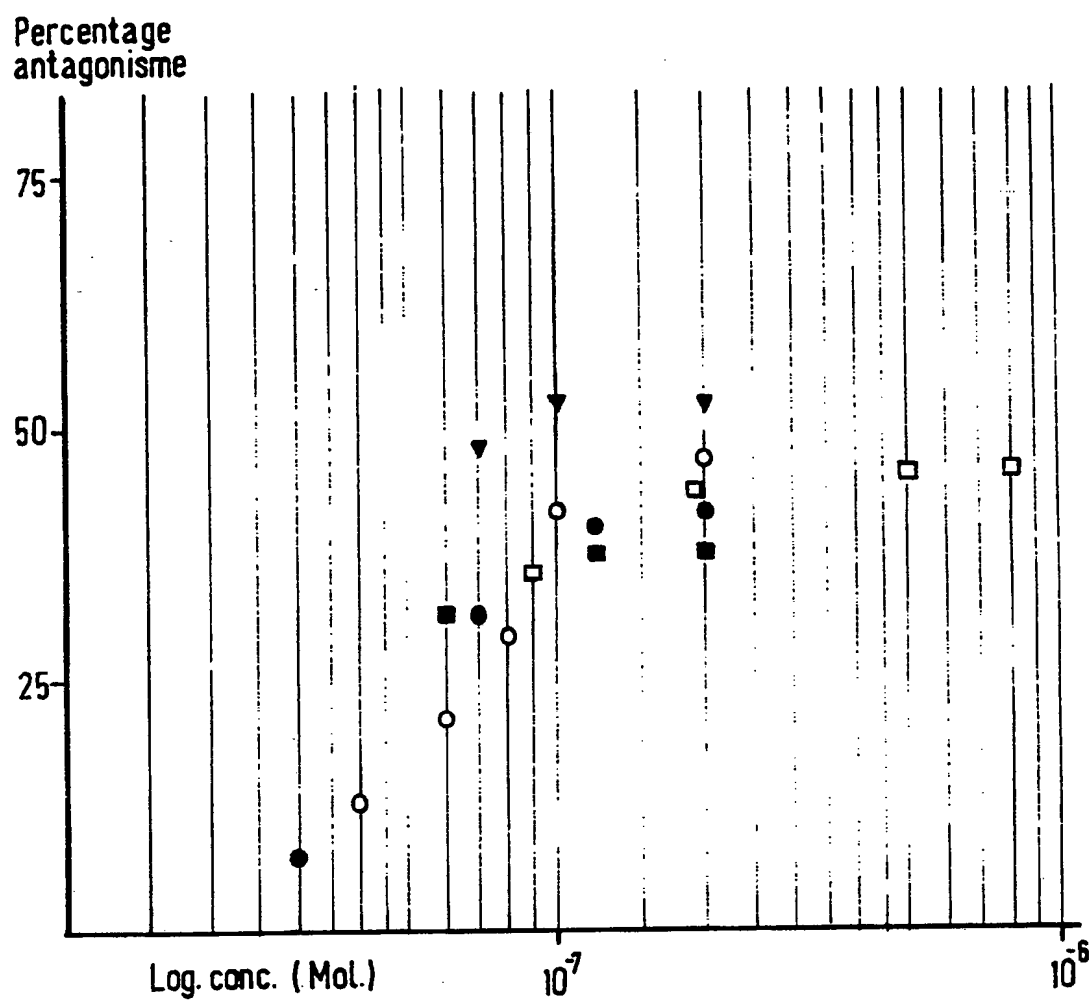


FIG. 2

8800350

Stichting Biomedical Research & Advice Group

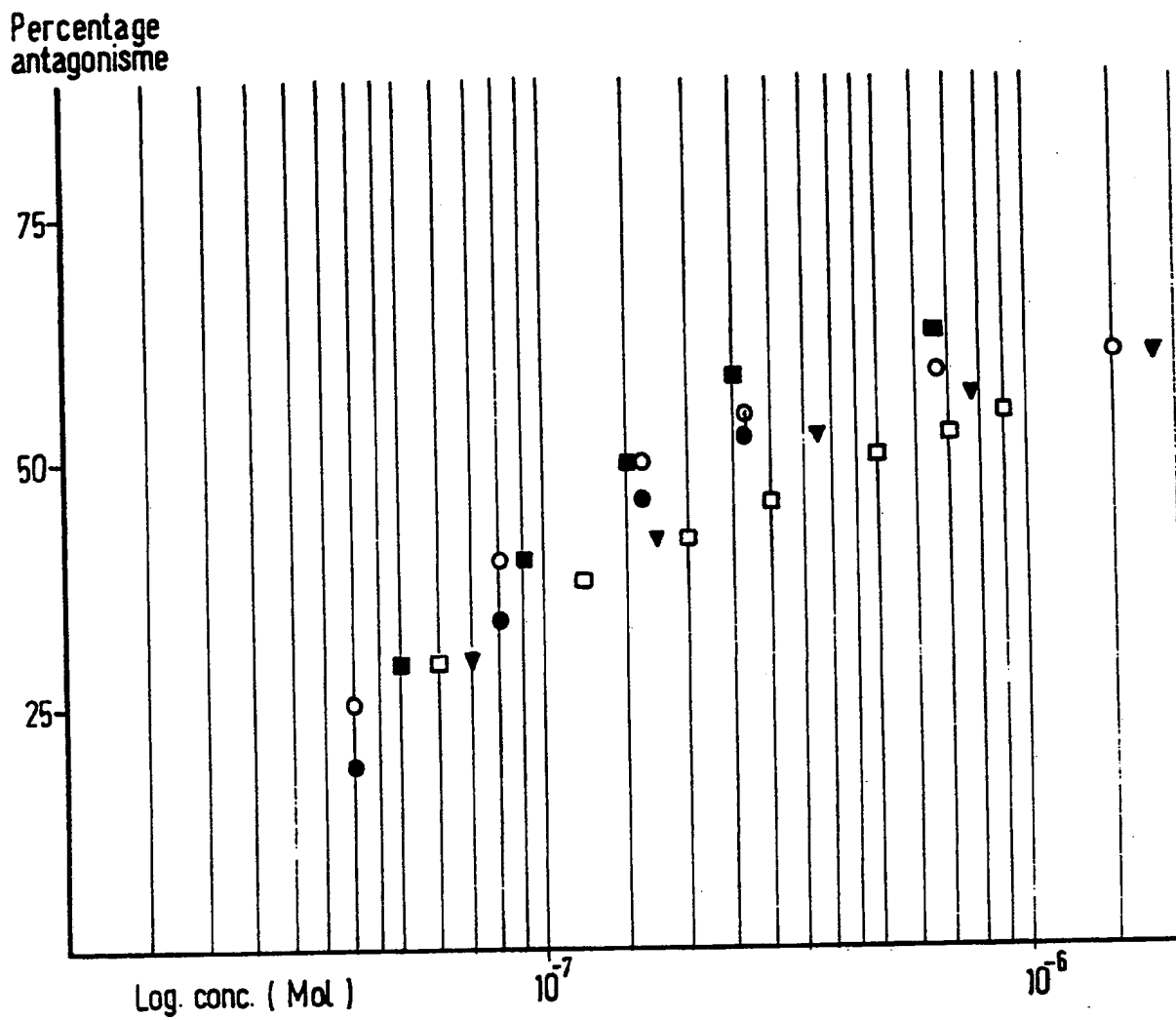


FIG. 3

. 8800350

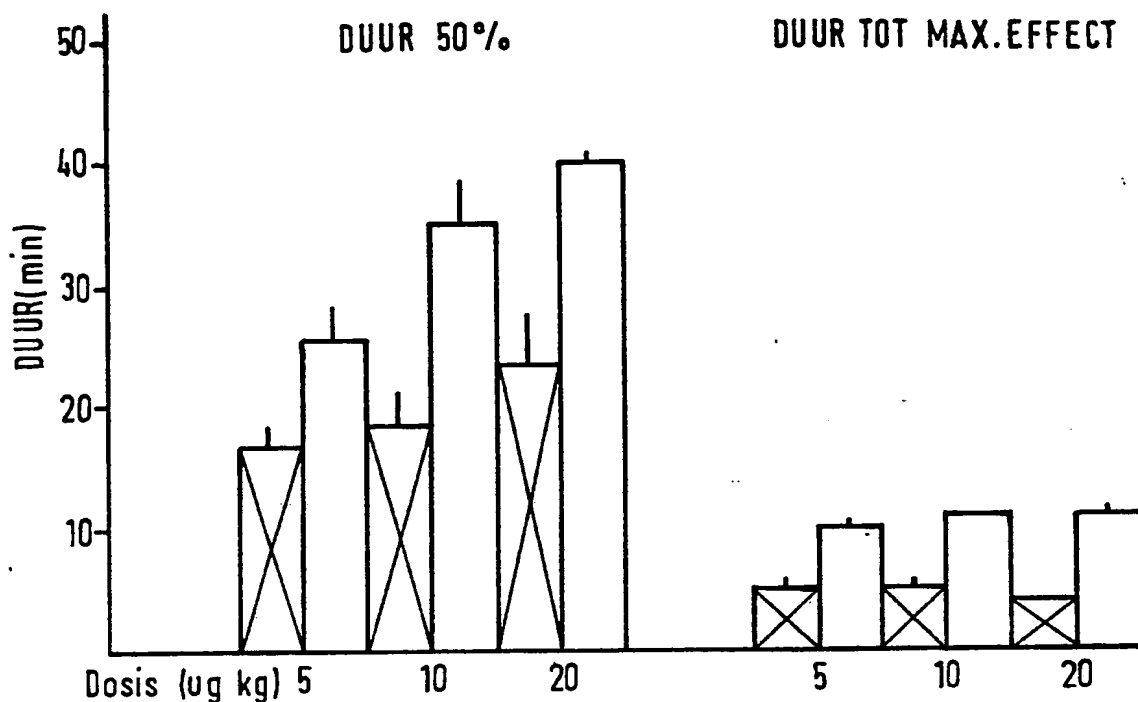


FIG.4

☒ N-ALLYL-6-O-DEMETHYLGALANTHAMINE JODIDE  
 □ NEOSTIGMINE METHYLSULFAAT

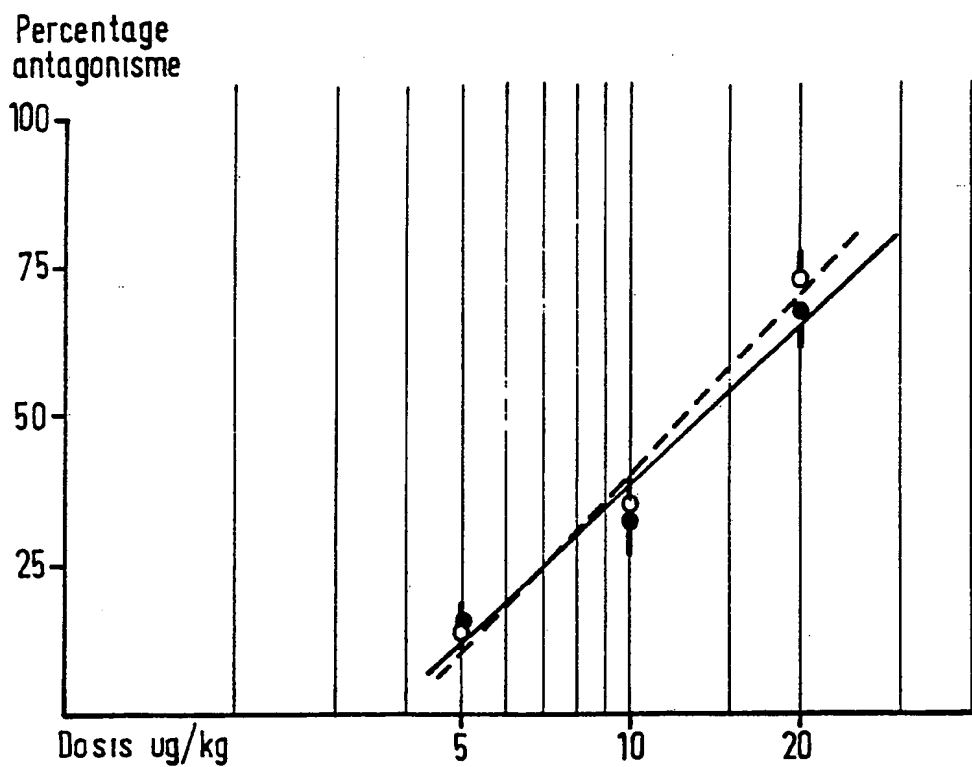


FIG.5

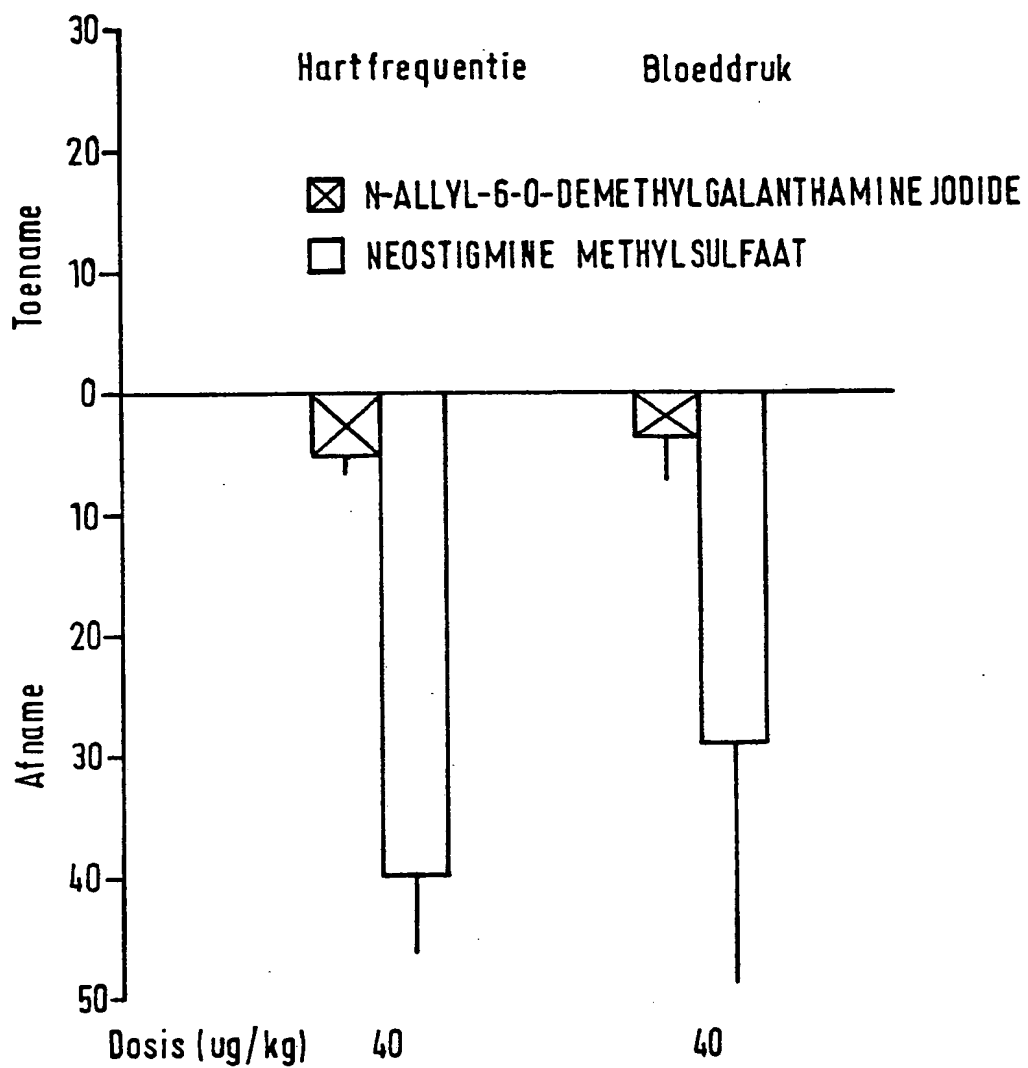
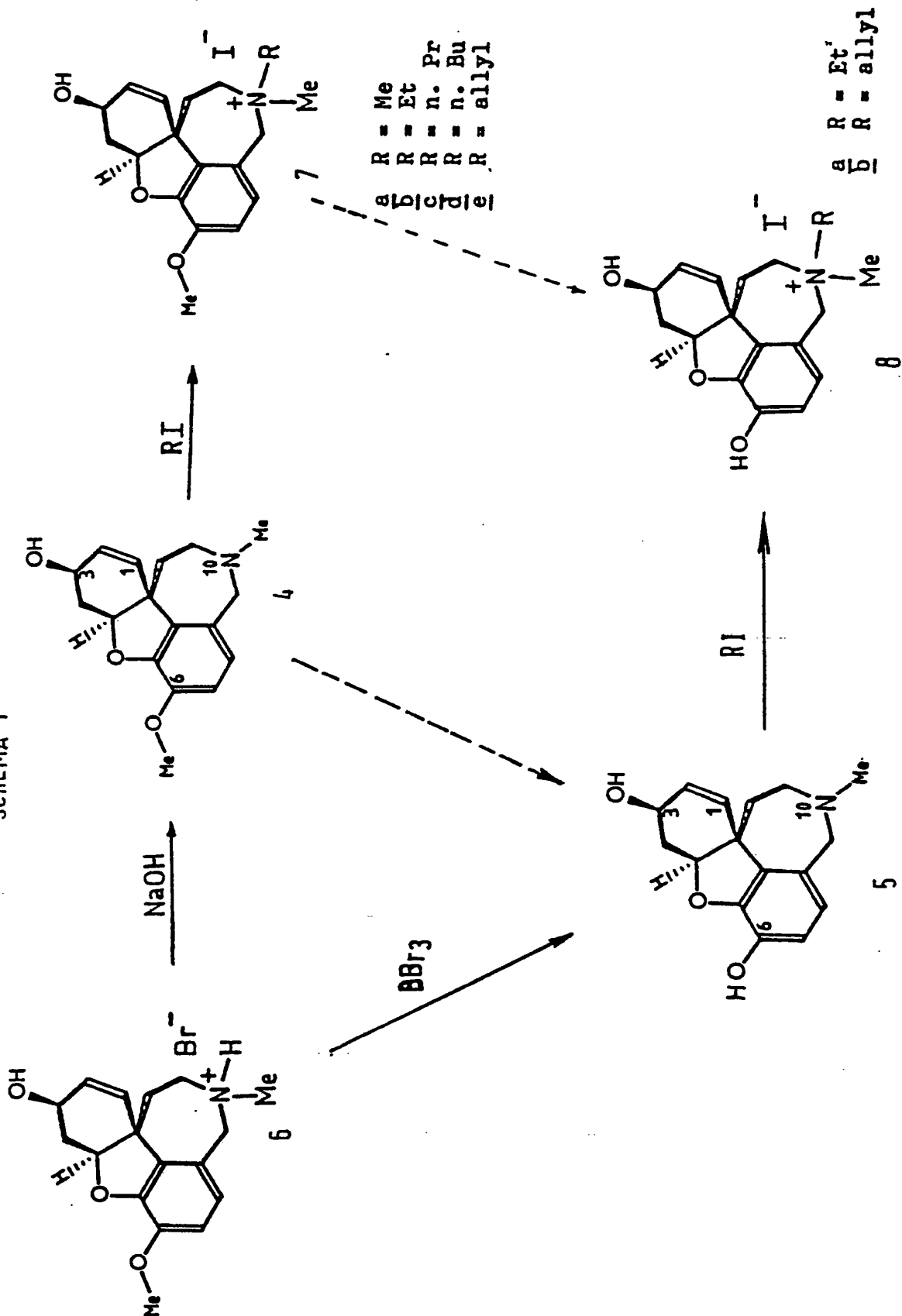


FIG.6

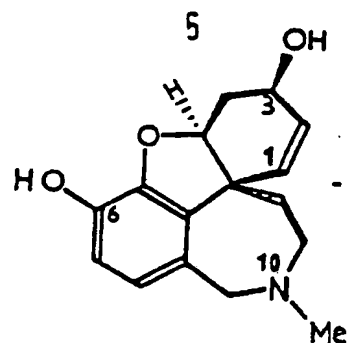
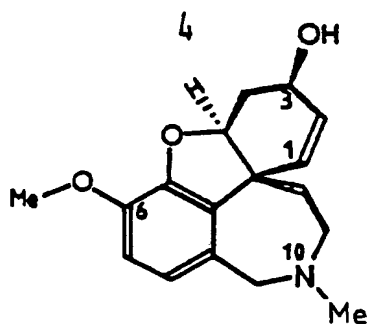
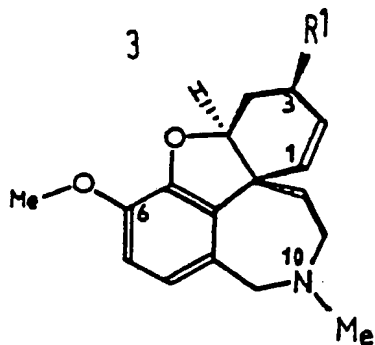
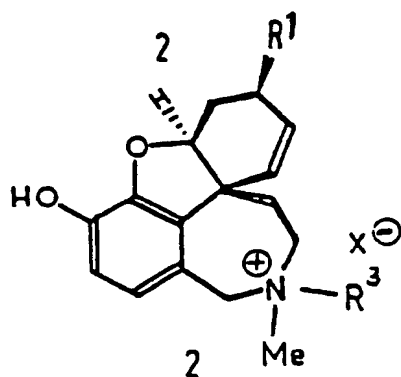
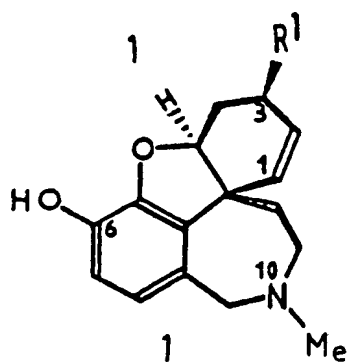
8800350

SCHEMA 1

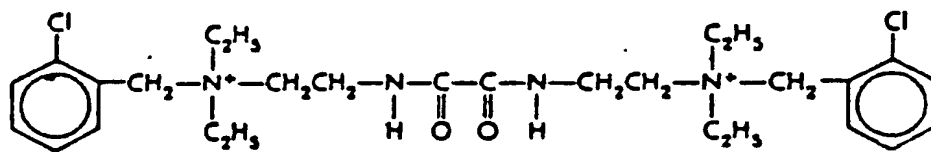


8800350

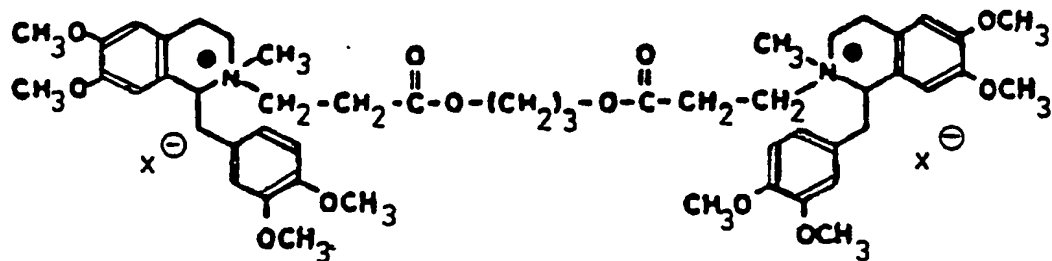
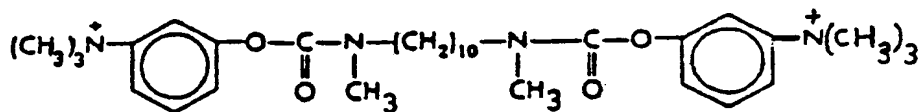
Stichting Biomedical Research & Advice Group



9

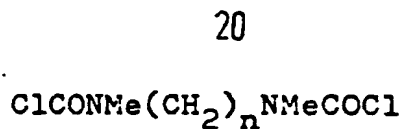
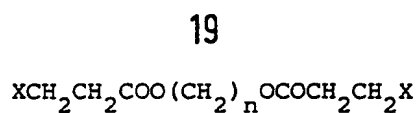
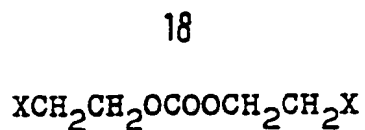
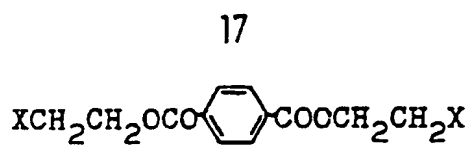
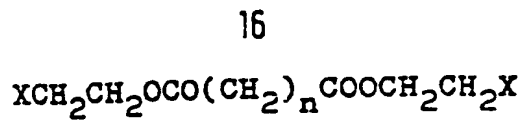
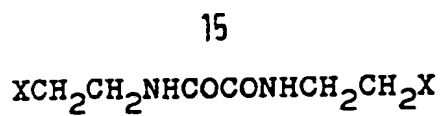
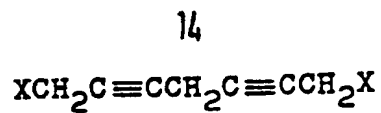
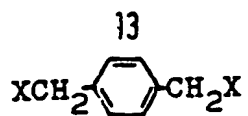
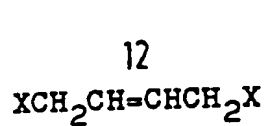


11



. 8800350





. 880 0350